

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 September 1999 (01.09.99)	
International application No. PCT/SE98/02463	Applicant's or agent's file reference Pha-1797-PCT
International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)	Priority date (day/month/year) 30 December 1997 (30.12.97)
Applicant MENDEL-HARTVIG, Ib et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 July 1999 (23.07.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

P. Regis

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WIDÉN, Björn
Pharmacia & Upjohn AB
Patent Dept.
S-112 87 Stockholm
SUÈDE

Date of mailing (day/month/year) 01 September 1999 (01.09.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference Pha-1797-PCT	
International application No. PCT/SE98/02463	International filing date (day/month/year) 30 December 1998 (30.12.98)

1. The following indications appeared on record concerning:	
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address WIDÉN, Björn Pharmacia & Upjohn AB Patent Dept. S-751 82 Uppsala Sweden	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No. 46 18 16 3000
	Facsimile No. 46 18 12 6077
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:	
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address WIDÉN, Björn Pharmacia & Upjohn AB Patent Dept. S-112 87 Stockholm Sweden	State of Nationality
	State of Residence
	Telephone No. 46 8 695 80 00
	Facsimile No. 46 8 695 42 78
3. Further observations, if necessary:	
4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer P. Regis Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

REC'D 27 APR 2000

WIPO PCT

Applicant's or agent's file reference Pha-1797-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/SE98/02463	International filing date (day/month/year) 30.12.1998	Priority date (day/month/year) 30.12.1997
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC7 G 01 N 33/53		
Applicant Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB et al		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23.07.1999	Date of completion of this report 03.04.2000
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Authorized officer Hampus Rystedt/ELY Telephone No. 08-782 25 00

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/SE98/02463

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

International application No.

V. Resoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Novelty (N)	Claims	<u>15-17, 29-31, 33</u>	YES
	Claims	<u>1-14, 18-28, 32</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u></u>	YES
	Claims	<u>1-33</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-33</u>	YES
	Claims	<u></u>	NO

The present application relates to a method for detecting analytes in a sample. The method utilizes a flow matrix, having a two or more application zones (LZ). One reactant, reactant I, is bound to the matrix in a detection zone (DZ), and another reactant, the analytically detectable reactant*, is added to (or predispensed in) the matrix in an LZ upstream from the LZ used for application of sample.

The following document is considered particularly relevant:

D1: EP-A2-306336

D2: WO-A1-9516914 (not cited in the search report)

D1 discloses a "multiple port assay device" consisting of a bibulous material (ie. a flow matrix), at least two application zones (in which the sample may be added to the downstream zone and a reagent may be added to the upstream zone, see column 21 lines 7-9) and a detection zone comprising an immunosorbing zone with immobilised antibodies. The application zones are separate from each other (see column column 4 lines 39-53). Reagents may be predeposited in the matrix (see column 22 lines 1-16). Claims 1-14, 18-28 and 32 lack novelty with regard to D1.

The use of internal calibrators in this type of assays is a standard technique, see D2. Claims 15, 16, 29, 30 and 33 are therefore considered to be implementations obvious to a person skilled in the art, and consequently they lack inventive step.

The use of the method or device of the application for diagnosing allergy or autoimmune diseases are considered obvious to a person skilled in the art. Claims 17 and 31 are therefore considered to lack inventive step.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 98/02463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6: G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, TXTE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0306336 A2 (SYNTEX (U.S.A.) INC.), 8 March 1989 (08.03.89), See esp. column 20, line 64 - column 22, line 61 --	1-33
A	WO 9202818 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION), 20 February 1992 (20.02.92) --	1-33
A	WO 9114942 A1 (PACIFIC BIOTECH, INC.), 3 October 1991 (03.10.91) -----	1-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 March 1999

Date of mailing of the international search report

28 -03- 1999

Name and mailing address of the ISA/

Swedish Patent Office

Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM

Facsimile No. + 46 8 666 02 86

Authorized officer

Hampus Rystedt

Telephone No. + 46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/03/99

International application No.

PCT/SE 98/02463

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0306336 A2	08/03/89	CA 1333046 A	15/11/94
		DE 3887941 D,T	01/09/94
		ES 2051303 T	16/06/94
		JP 1072066 A	16/03/89
		US 4981786 A	01/01/91
WO 9202818 A1	20/02/92	AU 8654891 A	02/03/92
WO 9114942 A1	03/10/91	AT 157457 T	15/09/97
		AU 650874 B	07/07/94
		AU 7676991 A	21/10/91
		CA 2076876 A	28/09/91
		DE 69127442 D,T	19/03/98
		EP 0525046 A,B	03/02/93
		ES 2107461 T	01/12/97
		US 5223220 A	29/06/93

PCT**REQUEST**

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. **PCT/ SE 98 / 02463**International Filing Date **30 -12- 1998**

The Swedish Patent Office
PCT International Application

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
 (if desired) (12 characters maximum) **Pha-1797-PCT**

Box No. I TITLE OF INVENTION	
Analytical method comprising addition in two or more positions and a device and test kit therefor.	
Box No. II APPLICANT	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB SE-751 82 UPPSALA Sweden	
<input type="checkbox"/> This person is also inventor.	
Telephone No. +46 18 16 30 00	
Facsimile No. +46 18 14 03 58	
Teleprinter No.	
State (that is, country) of nationality: SE	State (that is, country) of residence: SE
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) Mendel-Hartvig, Ib Rabeniusvägen 28 SE-756 55 UPPSALA Sweden	
This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: SE	State (that is, country) of residence: SE
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) Widén, Björn both with the address: Svanström, Pär Pharmacia & Upjohn AB Patent Department SE-751 82 UPPSALA Sweden	
Telephone No. +46 18 16 30 00	
Facsimile No. +46 18 12 60 77	
Teleprinter No.	
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

CORRECTED

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Zelikman, Ilya
Skymningsvägen 56
SE-743 32 STORVRETA
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
SE

State (that is, country) of residence:
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Rundström, Gerd
Bruksvägen 16
SE-752 41 UPPSALA
Sweden

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
SE

State (that is, country) of residence:
SE

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box N .V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

30-12-1998


B x N . VI PRIORITY CLAIM					<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:			
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office	
item (1) (1997/12/30) 30 December 1997	9704934-0	SE			
item (2)					
item (3)					

☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY			
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):	
ISA / SE		Date (day/month/year) 30 December 1997	Number SE 97/01647 Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING	
This international application contains the following number of sheets: request : 4 ✓ description (excluding sequence listing part) : 27 ✓ claims : 7 ✓ abstract : 1 ✓ drawings : sequence listing part of description : Total number of sheets : 39	This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input checked="" type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 295 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): ITS SE97/01647
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: Swedish

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT	
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).	
 Björn Widén	

For receiving Office use only		2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input checked="" type="checkbox"/> not received:
1. Date of actual receipt of the purported international application:	30-12-1998	
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:		
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):		
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / SE	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.	

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	10 FEBRUARY 1999
(10.02.99)	

30-12-1998

Pha-1797-PCT

1

**ANALYSFÖRFARANDE MED TILLSÄTTNING I TVÅ ELLER FLERA
POSITIONER OCH ANORDNING OCH TESTKIT FÖR DETTA**

Teknikområde

5 Uppfinningen avser ett förfarande för att bestämma en
analyt i ett prov med hjälp av biospecifika
affinitetsreaktanter (Reaktant 1, Reaktant 2 etc), av vilka
en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en är fast
förankrad i en detektionszon i en flödesmatris (Reaktant
10 I). Provet (analyten) förs av ett transportflöde i matrisen
från en appliceringszon för vätska (VZP) innehållande
analyten (provet) och/eller buffert till detektionszonen
(DZ), i vilken Reaktant I är fast förankrad. Samtidigt med
att provet transporteras i matrisen transporteras även de
15 av reaktanterna som är lösliga, inklusive Reaktant*. I de-
tektionszonen fångas Reaktant* upp i en mängd som är rela-
terad till mängden analyt i provet. För att detta skall
kunna ske är Reaktant* vald så att den kan biospecifikt
binda direkt till Reaktant I eller indirekt via en eller
20 flera tillsatta biospecifika affinitetsreaktanter
(inkluderande analyten). Mängden analyt bestäms sedan ur
mängd Reaktant* som bundits i detektionszonen. I
transportflödet kan finnas zoner, i vilka olika
biospecifika affinitetsreaktanter (exempelvis Reaktant*,
25 dock ej analyt) applicerats i förväg (fördeponerats) för
att upplösas och transporteras med flödet mot
detektionszonen.

Med reaktanter (inkluderande analyten), som uppvisar bio-
specifik affinitet (bioaffina reaktanter), avses enskilda
30 medlemmar i reaktantparen: 'antigen/hapten - antikropp;
biotin -avidin/streptavidin; två komplementära enkelkedjor
av nukleinsyra etc. Till antikroppar räknas antigen-
bindande antikroppsfragment såsom Fab, F(ab)₂', enkelkedje-
Fv-antikroppar (scFv) etc. Aktuella reaktanter behöver inte
35 vara naturligt förekommande utan kan även vara syntetiskt
framställda molekyler/bindare.

30 -12- 1998

2

Den aktuella typen av testmetodik har tidigare främst utnytt-jats för biospecifika affinitetsreaktanter där minst den ena i ett utnyttjat reaktantpar har uppvisat proteinstruktur, speciellt i samband med så kallade
5 immunkemiska bestämningsförfaranden.

Biospecifika affinitetsreaktioner utföres främst i vattenhaltiga medier (exempelvis vatten).

Den aktuella tekniken är välkänd och har ofta applicerats på så kallade testremsor, där remsan fungerat som
10 flödesmatris. Flödet har initierats i den zon till vilken provet sätts (VZP). Flödet har ofta varit lateralt, d.v.s. parallellt med matrisens yta, eller av andra typer, exempelvis i djupled av matrisen.

Testprotokollen har varit av så kallad inhibitionstyp
15 (kompetitiva) eller av icke-inhibitionstyp (icke-kompetitiva, sandwich). Se t.ex. Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbot US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232 och US 4,855,240; Abbot/Syntex US 4,740,468; Pharmacia AB, WO 96/22532 etc.

20 I sammanhanget talar man ofta om simultana och sekventiella metoder (protokoll) med avseende på vissa reaktanter (speciellt analyt och Reaktant*). Simultana varianter innebär att analyt (prov) och aktuell reaktant, exempelvis Reaktant*, transporteras in i detektionszonen
25 samtidigt. Simultana varianter kan man få, om prov förinkuberas/blandas med Reaktant* eller om Reaktant* fördeponerats i appliceringszonen för prov eller i en zon nedströms appliceringszonen för prov men före detektionszonen. Sekventiella varianter innebär att analyt (prov)
30 transporteras före en reaktant, exempelvis Reaktant*, in i detektionszonen. Sekventiella varianter kan man få, om aktuell reaktant, exempelvis Reaktant*, sätts till samma appliceringszon som provet efter det att provet (analyten) transporterats ut ur zonen. En variant av sekventiell
35 metodik diskuteras i US 4,855,240 (Becton Dickinson). Mot alternativet att prov (analyt) skall transporteras före "tracer" (=Reaktant*) i samma transportflöde, ställer US 4,855,240 skilda transportflöden, i vilka man reglerar

3 0 -12- 1998

transporttiden så att prov (analyt) når detektionszonen före "tracer" (Reaktant*).

I begreppet simultana tester har man ofta inkluderat varje variant, i vilken prov och Reaktant*
5 förinkuberas/blandas innan de sättes till en flödesmatris eller i vilken prov sättes till en flödesmatris i vilken Reaktant* är fördeponerad i appliceringszonen för prov eller nedströms denna. På liknande sätt har man i begreppet sekventiella tester inkluderat varje variant, i vilken
10 Reaktant* sättes till appliceringszonen för prov först sedan provet vandrat ut ur sin appliceringszon. Man har alltså inte tagit hänsyn till, om ordningen av analyt och Reaktant* förändras under transporten till detektionszonen. Om inget annat anges, användes denna nomenklatur även i
15 föreliggande uppfinning, men nu anpassad till att det finns flera appliceringszoner för vätska. Detta synsätt innebär att man främst betraktar den initiala ordningen, när både analyt och Reaktant* är i löst form, och inte ordningen i vilken analyt och Reaktant* transporteras in i
20 detektionszonen.

Nackdelar med tidigare teknik och mål med uppfinningen

Tidigare känd teknik har ofta inneburit praktiska problem vid automatisering, främst på grund av att det ofta krävs
25 förinkubering eller sekventiell tillsättning av prov och reaktanter, ofta i en viss förutbestämd ordning definierad av det testprotokoll, som skall användas. Uppfinningens mål är att (a) underlätta automatisering, (b) undvika sekventiell tillsättning av prov och den analytiskt
30 detekterbara reaktanten (Reaktant*) vid sekventiell metodik, och (c) möjliggöra fördeponerad Reaktant* vid sekventiell metodik, som avser analyt och Reaktant*. Mer generella mål är att uppnå högkvalitativa testresultat, gärna med förbättrad sensitivitet, och precision än
35 tidigare varianter gett.

3 0 -12- 1998

Uppfinning n

Vi har nu överraskande upptäckt, att, om flöde initierats genom i stort sett samtidig tillsättning av vätska till två intill varandra belägna zoner i en flödesmatris, vandrar
5 vätska tillsatt i den nedströms belägna zonen före vätska tillsatt i den uppströms belägna zonen i riktning mot detektionszonen. Vår upptäckt innebär, att man även kan få zonvis vandring av vätskor om tillsättning av vätska i en uppströms belägen zon sker efter tillsättning av vätska i
10 närmast nedströms belägna zon. Genom att tillämpa denna upptäckt på den aktuella typen av analysmetoder, kan man uppnå förbättringar med avseende på ovan angivna mål.

En första huvudaspekt av uppfinningen avser de inledningsvis nämnda analysmetoderna och kännetecknas av
15 att

A. flödesmatrisen uppvisar minst två appliceringszoner för vätska anordnade väsentligen intill varandra:

$$\begin{array}{ccccccc} VZ_m & . & . & . & VZ_n & . & . & . & VZ_1 & & DZ \\ & & & & & & & & & & \text{-----} > \end{array}$$

20 där

- a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, där n är positionen för appliceringszonen VZ_n (n är heltal $2 \leq n \leq m$)
- b) m är totala antalet appliceringszoner, i vilka flöde
25 initieras,
- c) en VZ_n är appliceringszon för prov (VZ_n, P) och en VZ_n är appliceringszon för Reaktant* (VZ_n, R^*) med $n'' \geq n'$,
- d) ----- > är riktningen på flödet, och
30 e) DZ är detektionszon, och

B. man initierar flöde genom att sätta vätska till vardera zonen $VZ_m . . VZ_n . . VZ_1$ på sådant sätt att vätska_{n+1}, som sätts till appliceringszon VZ_{n+1} , transporteras genom matrisen efter vätska_n som sätts till närmast nedströms
35 belägna appliceringszon VZ_n .

3 0 -12- 1998

5

Vätska $_{n+1}$ kan lätt fås att vandra omedelbart efter vätska $_n$, om motsvarande zoner för applicering av vätska ligger intill varandra eller om tillsätta vätskevolymen anpassas för detta mål.

- 5 I det vanligaste fallet innebär det ovan sagda att man sätter vätska $_{n+1}$ till VZ_{n+1} före eller i huvudsak samtidigt med att man sätter vätska $_n$ till VZ_n . För $n = m$ saknas VZ_{n+1} , varför det för den zonen inte går att sätta någon vätska till VZ_{m+1} . Praktiska fördelar uppnås om tillsättningen är i
- 10 huvudsak samtidig för alla $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$.

- Antalet (m) appliceringszoner för vätska ($VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$) kan i princip vara hur många som helst med undantag av en ($m \neq 1$). Av praktiska skäl är det troligt att i
- 15 framtiden $2 \leq m \leq 10$, med företräde för $2 \leq m \leq 6$, såsom $m = 2$ eller 3 eller 4 eller 5.

- Vätskorna som tillsättes (vätska $_1 \dots$ vätska $_m$) kan bestå av enbart buffertlösning eller av buffertlösning plus en reaktant (Reaktant 1, Reaktant 2 etc), som behövs för att
- 20 Reaktant* skall kunna fångas upp i detektionszonen i en mängd, som är relaterad till mängden analyt i provet. Även Reaktant* kan ingå i en vätska $_n$. Som regel gäller att sammansättningen av transporterade komponenter från en appliceringszon ej är samma som från närmast intilliggande appliceringszon, i vilken flöde initieras (VZ_{n+1} och VZ_{n-1}
- 25 med undantag för $n = m$ och $n = 1$ för vilka zonerna VZ_{n+1} respektive VZ_{n-1} saknas).

- Med uttrycket "väsentligen intill varandra" avses att appliceringszonerna för vätska ligger direkt intill varandra eller med ett mellanliggande område av matris, som
- 30 företrädesvis är högst ca 2 mm, särskilt högst ca 1 mm.

En vätska tillsatt i en appliceringszon kan ha en tendens till att sprida sig ovanpå matrisen till matrisdelar, som ligger utanför zonen. För närliggande zoner innebär detta

att vätskor kan blanda sig med varandra på ett icke-önskvärt sätt. För att undvika detta placerar man gärna fysiska barriärer, som avgränsar två närliggande appliceringszoner (zonavgränsare). Barriärerna bör först och främst vara placerade ovanpå matrisen, men kan stäcka sig ner i matrisen utan att helt strypa flödet.

Avgränsningen är främst mot en närliggande zon för applicering av vätska, men kan givetvis sträcka sig runt en hel appliceringszon för vätska. Vätska kan även tillföras via kuddar eller materialskikt anbringade ovanpå matrisen och av samma eller olika material än matrismaterialet. I sådant fall behövs inga zonavgränsare.

Aktuella reaktanter kan vara fördeponerade i en appliceringszon för vätska (VZ_n) eller mellan två sådana zoner. En appliceringszon för vätska, som bara är avsedd att transportera buffrande komponenter och/eller andra komponenter som ej deltar i de biospecifika affinitetsreaktionerna (d.v.s. vätska som varken innehåller eller är avsedd att transportera någon reaktant eller analyt), kallas fortsättningsvis för VZ_nB . En appliceringszon för vätska (VZ_n), där vätskan innehåller en reaktant eller är avsedd att transportera en reaktant, exempelvis Reaktant*, Reaktant 1, Reaktant 2 etc, kallas fortsättningsvis VZ_nR^* , VZ_nR1 , VZ_nR2 etc. Skall

vätska_n transportera en kombination av komponenter, exempelvis Reaktant* och analyt (prov) blir appliceringszonen gemensam för komponenterna och betecknas $VZ_nR2/R1$ etc. För kombinationen prov och Reaktant* blir appliceringszonen VZ_nR^*/P ($n' = n''$). Att vätska_n är avsedd att transportera en viss reaktant inkluderar att reaktanten ifråga även kan vara fördeponerad i zonen VZ_n . Det senare inkluderar att reaktanten kan vara fördeponerad i ett område nedströms appliceringszonen för den aktuella vätskan men uppströms närmast nedströms belägna VZ (VZ_{n-1}), eller om

$n = 1$ enbart uppströms detektionszonen (eftersom VZ_{n-1} då saknas).

Med fördeponering avses att en reaktant är tillsatt i förväg till matrisen och på sätt som gör att den ej sprider sig i matrisen förrän den nås av vätska, som applicerats för att initiera flöde. Fördeponering av reaktanter kan ske på i och för sig känt sätt. Se till exempel (Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232). Det är viktigt att man arrangerar, så att reaktanten i fråga snabbt går i lösning, när vätska passerar ett område, som innehåller fördeponerad reaktant. För att uppnå snabb upplösning har det varit vanligt att inkorporera reaktanter i substanser som i sig snabbt löses. Denna typ av substanser är ofta hydrofila med polära och/eller laddade grupper, såsom hydroxi, karboxi, amino, sulfonat etc. Speciellt kan nämnas hydrofila snabblösliga polymerer, exempelvis med kolhydratstruktur, enkla socker inkluderande mono-, di- och oligosackarider och motsvarande sockeralkoholer (mannitol, sorbitol etc).

Vanligt är att man först belägger den aktuella appliceringszonen med ett skikt av den snabblösliga substansen, varefter reaktanten appliceras, eventuellt följt av ytterligare ett skikt snabblöslig substans. Ett alternativt sätt är att inkorporera reaktanten i partiklar av snabblösligt material som sedan deponeras i aktuell zon av matrisen.

Några av de viktigaste utförandeformerna med avseende på appliceringszonerna för vätska kan sammanfattas: $2 \leq m \leq 6$; n' är 1, 2 eller 3; $n'' > m'$ eller $n'' = n'$; $VZ_{n,P}$ är appliceringszon för prov och eventuellt även för Reaktant* eller annan reaktant; $VZ_{n'+1}$, $VZ_{n'+2}$, $VZ_{n'+3}$, $VZ_{n'-1}$ och $VZ_{n'-2}$ är appliceringszoner för vätskor avsedda för transport av Reaktant* eller annan reaktant eller buffert utan reaktant så långt som m , n'' och n' det tillåter.

Transportflöde genom de aktuella typerna av matris kan åstadkommas genom kapillärkrafters inverkan, exempelvis genom att man startar med en i huvudsak torr matris. Som

30 -12- 1998

hjälp kan man placera en sugande kropp i slutändan av flödet. Flöde, som innebär transport i huvudsak av enbart lösta komponenter, kan åstadkommas om ett elektriskt fält appliceras över matrisen.

5

Testprotokoll

Med hjälp av uppfinningen kan man uppnå att reaktanter och analyt kan vandra zonvis som enskilda komponenter eller tillsammans i olika kombinationer mot detektionszonen.

10 Exakt sekvens av appliceringszoner bestäms av det testprotokoll man vill utnyttja.

Uppfinningen kan appliceras på såväl kompetitiva (inhibition) som icke-kompetitiva (icke-inhibition) testvarianter oberoende av om dessa är simultana eller sekventiella med avseende på någon reaktant. Illustrativa system visas nedan schematiskt i form de komplex som bildas. "-" avser fast förankring till matrisen, "---" avser bindning via biospecifik affinitet. För enkelhets skull har det antagits att använda reaktanter är monovalenta med avseende på utnyttjade bindningsställen.

20

A. Sandwich-protokoll (icke-inhibition):

Reaktant I och Reaktant* har båda biospecifik affinitet mot analyten. x = antal mol Reaktant I på matrisen och y = antal mol analyt (= antal mol Reaktant*), som bundit till Reaktant I.

25

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I)_{x-y}(-Reaktant I---analyt---Reaktant*)_y

Simultana varianter:

30

m = 2: VZ₂R*/P VZ₁B DZ

Sekventiella varianter:

m = 2: VZ₂R* VZ₁P DZ.

m = 3: VZ₃R* VZ₂B VZ₁P DZ och alternativ där buffertzonen har positionen 1 eller 3.

30 -12- 1998

9

m = 4: VZ_4B VZ_3R^* VZ_2B VZ_1P DZ och alternativ där någon av buffertzonererna är placerad i position 1.

5 m = 5: Samma sekvens som för m = 4 med undantag av att en extra buffertzonen är placerad i position 1.

B. Sandwich-protokoll (icke-inhibition):

Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot Reaktant II. Både Reaktant II och Reaktant* har biospecifik
10 affinitet mot analyten. x = antal mol Reaktant I på matrisen, y = antal mol analyt (= antal mol Reaktant*), som bundit till Reaktant I via Reaktant II. y + z är antal mol Reaktant II som bundit till Reaktant I. Komplex i detektionzonen:

15 Matris(-Reaktant I)_{x-z-y}(-Reaktant I---Reaktant II)_z(-Reaktant I---Reaktant II---analyt---Reaktant*)_y

Simultana varianter:

m = 2: Samma som för protokoll A med undantag av att VZ_2R^*/P är $VZ_2R^*/P/RII$ eller att VZ_1B är VZ_1RII .

20 m = 3: VZ_3R^*/P VZ_2B VZ_1RII DZ eller VZ_3R^*/P VZ_2RII VZ_1B DZ.

Sekventiella varianter:

m = 2: Samma som för protokoll A med undantag av att VZ_1P ersättes med VZ_1P/RII .

25 m = 3: VZ_3R^* VZ_2B VZ_1P/RII DZ eller VZ_3R^* VZ_2P VZ_1RII DZ eller VZ_3R^* VZ_2P/RII VZ_1B DZ.

30 m = 4, 5, 6: I analogi med protokoll A kan man tänka sig sekvenser med upp till 6 appliceringszoner för vätska.

C. Inhibitionsprotokoll:

Reaktant I är en analytanalog, som är fast förankrad till matrisen, Reaktant III uppvisar biospecifik
35 affinitet mot analyten och Reaktant* uppvisar

30 -12- 1998

10

biospecifik affinitet mot Reaktant III. x = antalet mol Reaktant I på matrisen. y = antalet mol Reaktant III (= antal mol Reaktant*), som bundit till matrisen via Reaktant I. Betingelserna är valda så att y är ett mått på mängd analyt i provet.

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I) _{$x-y$} (-Reaktant I---Reaktant III---Reaktant*) _{y}

Simultana varianter:

10 $m = 2$: $VZ_2R^*/RIII/P$ VZ_1B DZ.

Sekventiella varianter:

$m = 2$: VZ_2R^* $VZ_1/RIII/P$ DZ.

$m = 3, 4$ och 5 : Kan byggas upp i analogi med protokoll A.

15

D. Inhibitionsprotokoll:

Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet mot både Analyt och Reaktant*. Reaktant* är analytanalog som är löslig. $x + y$ är antalet mol Reaktant I på matrisen, x och y är antalet mol Reaktant* respektive Analyt, som bundit till matrisen.

20

Komplex i detektionszonen:

Matris(-Reaktant I---Reaktant*) _{x} (-Reaktant I---Analyt) _{y} :

Simultan variant:

25 $m = 2$: VZ_2R^*/P VZ_1B DZ

Sekventiell variant:

$m = 2$: VZ_2R^* VZ_1P DZ

$m = 3, 4$ och 5 kan byggas upp i analogi med protokoll A.

30

Matriser

Matrisen definierar det rum i vilket flödet transporteras. Matrisen kan vara den inre ytan av en enkel flödeskanal (exempelvis en kapillär), den inre ytan av en porös matris med genomgående system av flödeskanaler (porös matris) etc. För enkelhets skull kommer matriser, som är

35

användbara i denna variant av uppfinningen att kallas för flödesmatriser. Porösa matriser kan vara i form av monoliter, ark, kolonner, membraner, enskilda flödeskanaler av kapillära dimensioner eller sammansatta system av dylika flödeskanaler etc. De kan även vara i form av partiklar som packats i kolonnhylsor, sammanpressade fibrer etc. Matriserens inre yta, d.v.s. flödeskanalernas yta, bör vara hydrofil, så att vattenhaltiga medier (vanligen vatten) kan absorberas och transporteras genom matriserna. Flödeskanalernas minsta innermått skall vara tillräckligt stort, så att de reaktanter, som används, kan transporteras genom matrisen. Tumregeln är att lämpliga matriser finns att välja bland de som har flödeskanaler med minsta innermått (ofta som en diameter för runda kanaler) i intervallet 0,4-1000 μm , med företräde för 0,4-100 μm om matrisen uppvisar ett system av sinsemellan kommunicerande flödeskanaler. Flödeskanaler med minsta innermått i den övre delen av intervallet 0,4-1000 μm är främst aktuellt för enkla ogrenade kanaler, genom vilka flöde drivs av externt pålagt tryck eller sug.

Aktuella matriser är ofta uppbyggda av en polymer, exempelvis nitrocellulosa, nylon etc. Materialet i matrisen såväl som flödeskanalernas fysiska och geometriska utformning kan variera utefter flödet beroende på vad en viss del av matrisen skall utnyttjas till (Pharmacia AB WO 96/22532; Medix WO 94/15215).

Detektionszon

I detektionszonen finns Reaktant I fast förankrad till matrisen med bindningar, som ej tillåter oavsiktlig borttransport av Reaktant I under testbetingelserna. Uppfästning av Reaktant I på matrisen kan vara kovalent, via fysikalisk adsorption, via biospecifik affinitet etc. Liksom i tidigare teknik inom området kan uppfinningen utnyttja kombinationer av bindningstyper, exempelvis kovalent bindning till matrisen av en biospecifik affinitetsreaktant riktad mot Reaktant I. Speciellt kan nämnas matris, som uppvisar en fysikalisk adsorptivt eller

kovalent bunden komponent i ett specifikt bindningspar (reaktantpar) i kombination med Reaktant I kopplad eller konjugerad till den andra komponenten i det specifika bindningsparet, eller matris, som uppvisar en på liknande sätt bunden antikropp riktad mot Reaktant I. Som exempel på specifika bindningspar kan nämnas immunologiska bindningspar som antigen-antikropp och haptent-antikropp, biotin-avidin eller -streptavidin, lektin-socker, hormon-hormonreceptor, nukleinsyraduplex. Om Reaktant I binder till matrisen via en annan reaktant enligt ovan, behöver Reaktant I inte vara immobiliserad i matrisen utan kan antingen vara rörligt (diffunderbart) fördeponerad i matrisen i en area eller zon som är skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från provet. Förankring av Reaktant I till matrisen kan ske via partiklar som deponerats i/på matrisen och till vilka Reaktant I är kovalent, fysikaliskt adsorptivt eller biospecifikt etc bunden. Partiklarna fäster till matrisen antingen därför att deras storlek valts så att de ej kan transporteras genom matrisen eller också via fysikalisk adsorption. Se bland annat Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376; Hybritech EP 437,287 och EP 200,381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012. För uppfinningen har den senare varianten med mindre partiklar som fysikaliskt adsorberar till matrisen visat sig vara bra.

I ett och samma transportflöde kan finnas flera detektionszoner (DZ1, DZ2 etc). En eller flera av detektionszonerna kan avse samma eller olika analyter. Är analyterna olika är som regel Reaktant I för respektive DZ olika.

Analytiskt påvisbar reaktant (Reaktant*)

Reaktant* kan i uppfinningen inte vara analyt. Vanligen erhålles analytisk detekterbarhet genom att en naturlig reaktant, exempelvis en antikropp eller ett antigen eller en haptent, förses med en analytiskt detekterbar grupp.

Välkända exempel på ofta använda grupper är enzymatiskt aktiva grupper (enzym, kofaktor, koenzym, enzymsubstrat etc), fluorogena, kromofora, kemiluminiscenta, radioaktiva grupper etc. Även grupper som påvisas med hjälp av en biospecifik affinitetsreaktant brukar räknas hit, exempelvis biotin, haptén, klass-, subklass- och artspecifika determinanter i immunglobuliner etc.

- En fördelaktig markörgrupp är partiklar som eventuellt innehåller någon av de ovan nämnda detekterbara grupperna, såsom fluorofora grupper eller kromogena grupper (färgade partiklar). Användbara partiklar har ofta en storlek i intervallet 0.001-5 μm . Partiklarna kan vara av kolloidala dimensioner, s.k. sol (d.v.s. vanligen sfäriska och monodispersa med storlek i intervallet 0,001-1 μm).
- Speciellt kan nämnas metallpartiklar (exempelvis guldsol), icke-metallpartiklar (exempelvis SiO_2 , kol, latex och avdödade erythrocyter och bakterier). Även partiklar av icke-kolloidala dimensioner men tonvikt lagd på icke-sedimenterbarhet har använts. Dessa har varit mer eller mindre oregelbundna och mer eller mindre polydispersa (kolpartiklar < 1 μm ; Pharmacia AB, WO 96/22532).

För partiklar som markörgrupp hänvisas till Unilever WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232 m.fl.

- I samband med utvecklingsarbetet som lett fram till föreliggande uppfinning har man överraskande funnit att bra resultat kan erhållas om man samtidigt utnyttjar:

- (a) Reaktant* med markörpartiklar enligt ovan som påvisbar grupp, och
- (b) En detektionszon i vilken Reaktant I förankrats till matrisen via partiklar som i huvudsak har dimensioner som skulle tillåta transport av partiklarna som sådana genom matrisen.

- Vi har uppnått fungerande system, i vilka markörpartiklar och förankringspartiklar har i huvudsak samma dimension. Detta innebär med stor sannolikhet att markörpartiklarna kan vara större än förankringspartiklarna och vice versa,

så länge som de bara är mindre än de flödeskanaler som matrisen definierar. Systemet kan fungera såväl med som utan fördeponering av Reaktant* i avsedd appliceringszon. Denna utförandeform utgör en del av en uppfinning, som
5 beskrives i vår samtidigt med denna inlämnade PCT-ansökan "Analysmetod med partiklar och testkit för utförande av metoden" (baserad på SE 9704935-7). Denna separata patent-ansökan inkorporeras "by reference".

10 **Analyter.**

Uppfinningen är främst avpassad för att bestämma biospecifika affinitetsreaktanter av de inledningsvis nämnda slagen. Reaktanterna kan vara en cell eller virus eller del av dessa. Speciellt kan nämnas antigen, såsom ett
15 immunglobulin eller en antikropp. För immunglobuliner kan bestämningen avse en viss Ig- och/eller viss Ig-subklass. För antikroppar kan bestämningen avse en viss specificitet, eventuellt även antikroppens Ig-klass eller Ig-subklass. Aktuella Ig-klasser är IgA, IgD, IgE, IgG och IgM. Aktuella
20 Ig-subklasser är IgG1, IgG2, IgG3 och IgG4.

I sandwich-varianter (enligt protokoll A och B ovan) kan analyten vara en antikropp, som är riktad mot ett allergen/antigen/hapten, och härstamma från en viss art, viss Ig-klass eller viss Ig-subklass. I detta fall kan
25 Reaktant* vara en analytiskt detekterbar antikropp riktad mot en epitop som är specifik för arten, Ig-klassen eller Ig-subklassen och med Reaktant I (protokoll A) eller Reaktant II (protokoll B) som allergenet/antigenet/haptenet. Alternativt väljer man det omvända, d.v.s.
30 Reaktant* är allergenet/antigenet/haptenet och Reaktant I respektive Reaktant II är antikroppen, som är riktad mot analyten. För det fall att analyten är ett antigen i allmänhet kan för protokoll A både Reaktant I och Reaktant* vara antikroppar, som är riktade mot antigenet. För
35 protokoll B är det Reaktant II och Reaktant* som är antikroppar riktade mot antigenet.

Kompetitiva varianter är mest intressanta för lågmolekylära analyter. Illustrativa exempel är antigen och

3 0 -12- 1998

15

haptent. För protokoll C kan Reaktant I vara antigenet eller haptentet, som är fast förankrat till matrisen, Reaktant III kan vara en antikropp, som är riktad mot antigenet, och Reaktant* kan vara en antikropp, som är riktad mot Reaktant
5 III. För protokoll D kan Reaktant I vara en antikropp riktad mot analyten och Reaktant* kan vara analyten märkt med en analytiskt detekterbar grupp.

Uppfinningens metod kan utföras som en del i diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.

10 För uppfinnarna har det varit speciellt intressant att mäta anti-allergen antikroppar av IgE- eller IgG-klass, för de senare gärna med tonvikt på någon av de nämnda subklasserna. Mätning av allergen-specifika antikroppar kan utnyttjas i samband med diagnosticering av IgE-medierad
15 allergi.

Prover

Aktuella prover kan vara av biologiskt ursprung, exempelvis från olika kroppsvätskor (helblod, serum,
20 plasma, urin, saliv, tårvätska, cerebrospinalvätska etc), från cellodlingsmedier, upparbetningsförfaranden inom bioteknik, från vävnadsextrakt, från livsmedel, från miljön (miljöanalysprover) etc. Proverna kan vara förbehandlade för att passa till exempelvis matrisen, testprotokollet som
25 ingår etc.

Kalibratorer

Bestämningsmetoder av den typ, som uppfinningen avser, innebär, att man mäter den påvisbara signalen från den
30 analytiskt detekterbara reaktanten (Reaktant*) och tar den uppmätta signalen (provvärde) som ett mått på mängden analyt i provet. För att överföra mätsignalen till verkliga mängder analyt jämföres signalen vanligen med motsvarande signal (kalibratorvärde) för kända standardmängder analyt
35 (kalibratorer). I samband med föreliggande uppfinningen har man utvecklat ett nytt kalibratorsystem, vilket applicerat på denna uppfinning utgör en bästa utförandeform.

3 0 -12- 1998

Denna separata uppfinning innebär, att den kalibrator, som utnyttjas, har i förväg förankrats till en matris (matriskalibrator), helst av samma slag som den som utnyttjas för provkörning. Vid upptagning av

5 kalibratorvärden får matriskalibrator binda till Reaktant*, varefter mätsignalen från Reaktant* mätes på i och för sig känt sätt. Genom att utnyttja olika mängder matriskalibrator kan man få en serie kalibratorvärden som svarar mot olika förutbestämda mängder analyt i prov
10 (standardmängder, dos-responskurva, kalibreringskurva).

Alternativt har istället en bindare för kalibratoren förankrats till matrisen, varvid kalibrator tillförs vid bestämningen av kalibratorvärde, eventuellt fördeponerad i matrisen uppströms kalibratorzonen (-erna) för att lösas
15 upp av provlösning eller buffert vid bestämningen. När en kalibratorbindare är bunden till matrisen, kan kalibratoren antingen vara rörligt (diffunderbart) fördeponerad i matrisen i en zon skild från detektionszonen, eller också kan den tillsättas tillsammans med eller separat från
20 provet. Kalibratorbindaren är vanligtvis den ena komponenten i ett specifikt bindningspar (reaktantpar), varvid den andra komponenten i bindningsparet är kopplad eller konjugerad till kalibratorsubstansen. Som exempel på sådana specifika bindningspar kan nämnas immunologiska
25 bindningspar som antigen-antikropp och haptent-antikropp, biotin-avidin eller -streptavidin, lektin-socker, hormonhormonreceptor, nukleinsyraduplex.

Applicerat på föreliggande uppfinning, innebär vårt nya kalibratorsystem främst att transportflödet passerar en
30 eller flera zoner med en kalibrator eller kalibratorbindare, som är fast förankrad till matrisen i respektive kalibratorzon (KZ).

Förankring av en kalibrator till matrisen i en kalibratorzon kan ske enligt samma principer som gäller för
35 att förankra Reaktant I till en detektionszon.

Kalibratorzoner skall vara belägna nedströms appliceringszon för vätska, som avser transport av

Reaktant*. I förhållande till detektionszon (DZ) ligger kalibratorzonern företrädesvis uppströms.

Vår uppfinning avseende kalibratorer finns utförligt beskriven i vår parallellt inlämnade PCT-ansökan med titeln
5 "Metod som utnyttjar en ny kalibrator och anordning och testkit som innehåller kalibratoren" (baserad på SE 9704933-2). Denna ansökan inkorporeras härmed "by reference".

En andra huvudaspekt av uppfinningen

10 Flödesmatrisen enligt ovan innehållande två eller flera appliceringszoner för vätska, eventuellt i form av ett kit där flödesmatrisen ingår tillsammans med den analytiskt indikerbara reaktanten, utgör en andra huvudaspekt av uppfinningen.

15 Uppfinningen illustreras i den följande ej begränsande experimentella delen.

EXEMPEL 1: SEKVENTIELL METOD MED ZONSEKVENSEN: VZ_4B , VZ_3R^* , VZ_2B , VZ_1P ,
DZ. DETEKTION AV HIGE I TESTVARIANT MED KOLPARTIKELKONJUGAT

20

Metoder och material

Adsorption av fenyl-dextran till polystyrenpartiklar:

Fenyl-dextran (substitutionsgrad: 1 fenylgrupp på var femte monosackaridenhet = 20 %, Mw dextran 40 000, Pharmacia
25 Biotech AB, Uppsala, Sverige) adsorberades till polystyrenpartiklar (0.49 μ m Bangs Laboratories, USA) genom inkuberingar under omrörning med fenyl-dextran löst i avjoniserat vatten till 1) 5 mg/ml, 10 % partikelsuspension, RT 30-60 minuter; 2) 5 mg/ml, 5%
30 partikelsuspension, RT 1 timme; 3) 20 mg/mL, 1-2% partikelsuspension, RT 3 timmar eller över natt. Partiklarna tvättades därefter två gånger med avjoniserat vatten. Partikelsuspensionerna centrifugerades mellan varje inkubering och tvätt (12.100xg, 25 min, Beckman, J-21, JA-
35 20, 10.000 rpm). Partikelsuspensionen sonikerades slutligen (Ultraljudsbad, Branson 5210, 5 min).

Koppling av anti-human-IgE-antikropp (anti-hIgE) till polystyrenpartikel: Anti-hIgE kopplades till polystyrenpartiklar belagda med fenylldextran med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-pyridiniumbromid (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210).

Avsaltning och buffertbyte av anti-hIgE utfördes genom gelfiltrering (PD-10, Pharmacia Biotech AB) i NaHCO_3 , 0.1 M, pH 8,5. 2,3 g polystyrenpartiklar (belagda med fenylldextran enligt ovan) i 2% lösning i 30 vol% aceton aktiverades med 17 ml CDAP (0.44 M) och 14 ml TEA (0,2 M trietylamin, Riedel-deHaën, Tyskland). CDAP tillsattes under omrörning 150 sek och TEA under 150 sek. Partiklarna tvättades med 30 vol% aceton och centrifugerades vid 12.100xg (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10.000 rpm). 17 mg anti-hIgE kopplades till de aktiverade partiklarna (2%, 0,15g i 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5) vid inkubering under omrörning över natt +4°C. Partiklarna centrifugerades och dekanterades därefter innan de avaktiverades med glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05 M i 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5, vid inkubering under omrörning över natt +4°C. Kopplade partiklar tvättades 1 gång med 0,1 M NaHCO_3 , 0,3 M NaCl, pH 8,5, 1 gång med 0,1 M HAc, 0,3 M NaCl pH 5, 1 gång med 0,1 M NaHCO_3 pH 8,5 och en gång med 20 mM boratbuffert pH 8,5.

Partikelkoncentration bestämdes spektrofotometriskt vid $A_{600 \text{ nm}}$ med obehandlade partiklar som referens. Kopplad proteinkoncentration bestämdes genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid kopplingen och cpm-mätning.

Kolpartikelkonjugat (Reaktant*): Detta framställdes genom att anti-hIgE adsorberades till kolpartiklar (sp100, < 1 μm , Degussa, Tyskland) enligt WO 96/22532 (Pharmacia AB). Den slutliga lösningen som användes i flödesmatris innehöll 400 μg kolpartiklar per ml.

Deponering av anti-hIgE-kopplade partiklar på membran: På nitrocellulosaflak (Whatman, 8µm, 5cm lång och 25 cm bred med polyesterbaksida deponerades anti-hIgE-partiklar (framställda enligt ovan) i en zon över arkets bredd (blivande detektionszon) med Linear Striper (IVEK Corporation). Flödet var 1 µL/sek och 1 µL/cm. Partiklarna var spädda i boratbuffert (20 mM, pH 8,5, dextran T5000 4,2 %w/w, sorbitol 5,8 %w/w). Mängd deponerad anti-IgE antikropp var ca 1000 ng/cm. Flaken torkades 1 timme vid 30°C.

Zoner för applicering av buffert, prov och kolpartikelkonjugat: Väl avskilt från zonen, som innehöll deponerat material, placerades parallellt med zonen och parallellt med varandra 4 stycken 1 mm breda inplastorremsor (Mylar med lim på ena sidan, Gelman) på 5 mm avstånd från varandra (zonavgränsare). Inplastorremsorna definierade på detta sätt fyra 5 mm breda zoner. Flaken klipptes vinkelrätt mot zonen innehållande deponerat material till remsor med 0,5 cm bredd (längden på remsan blev då 5 cm) (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic automation). De slutliga remsorna uppvisade fyra zoner (appliceringszoner) åtskilda av inplastorremsor som zonavgränsare och en separat zon med deponerad anti-hIgE-antikropp (detektionszon). Som jämförelse tillverkades remsor utan zonavgränsare, d.v.s. utan åtskilda appliceringszoner.

Testmetodik: Remsor med åtskilda appliceringszoner monterades på en plan hållare. Upptill (0.5 cm) på remsan (och med detektionszonen som närmaste zon) placerades ett sugande membran (Whatman, 17 Chr, bredd 3 cm). Hållaren gav också ett konstant tryck på de sugande membranen. För simultan applicering av reagens till de fyra delzonerna användes en 4-kanalers Multipipett (Labsystems). Multipipetten laddades så att serumprov (30 µL) applicerades i appliceringszonen närmast detektionszonen med ordningen buffert (30 µL), kolpartikelkonjugat (30 µL) och

buffert (30+30 µL) i respektive uppströms belägen appliceringszon. För sekventiell applicering till remsorna utan zonavgränsare applicerades först 30 µL prov på nederkanten av remsan. Efter insugning av provvolym

5 tillsattes i tur och ordning efter insugning buffert (30 µL), kolpartikelkonjugat (30 µL) och buffert (30+30 µL). Kolpartikelkonjugatet var framställd enligt ovan och var suspenderat i buffert. Bufferten var NaPO₄ 0,1 M, BSA 3 %, NaN₃ 0,05 %, sukros 3 %, NaCl 0,2 %, fenylidextran 0,05 %, 10 bovin gammaglobulin 0,05 %, pH 7,5. Kolpartikelkonjugatets bindning till detektionszonen kvantifierades genom absorptionsmätning (ultroskan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB). Som prov användes IgE med standardkoncentrationer i plasmamiljö (0; 0,5; 2; 10; 50 och 200 15 KU/L).

Resultat

Med fyra appliceringszoner för vätska och simultan tillsättning vandrade vätskorna i appliceringszonernas

20 ordning, d.v.s. provet som var i zonen närmast detektionszonen vandrade först, utan att blandas med efterkommande appliceringszons tvättlösning, som i sin tur startade att vandra, när provet hade transporterats ut ur appliceringszonen för prov. På motsvarande sätt vandrade de 25 övriga zonernas vätskor i sekvens utan att blandas.

Tabell 1: Analysresultat från körningar med sekventiell tillsättning i en zon och från simultan tillsättning i 4 30 delzoner (buffert, analytiskt detekterbar reaktant, buffert, prov).

30-12-1998

21

		Sekventiell tillsättning i en zon (Abs x1000)	Simultan tillsättning i 4 delzoner (Abs x1000)
5	IgE KU/L		
	0,5	0	12
	2	312	207
	10	1241	831
	50	1921	1560
	200	2115	2044

10

I tabell 1 visas att upptaget minskar något för remsor med diskreta appliceringszoner jämfört med när tillsättning sker i en och samma zon. Minskningen är dock marginell. Försöket visar därför att man kan uppnå i stort sett samma resultat om samtidig tillsättning sker till zonsekvensen VZ₄B, VZ₃R*, VZ₂B, VZ₁P som om prov, Reaktant* och buffert sättes i sekvens till en gemensam appliceringszon.

Om fast förankrad anti-IgE-antikropp (Reaktant I) byts ut mot ett allergen, får man en bestämningsmetod av IgE antikroppar riktade mot allergenet. På analogt sätt kan testsystem avseende antikroppar av annan klass/subklass och med annan specificitet bestämmas. Appliceringszoner för enbart buffert kan utelämnas. För ytterliggare alternativa testprotokoll och analyter se ovan under rubrikerna "Testprotokoll" och "Analyter".

30

EXEMPEL 2: SEKVENTIELL METOD MED ZONSEKVENSEN: VZ₄B, VZ₃R*, VZ₂B, VZ₁P, DZ. DETEKTION AV hige I TESTVARIANT MED FLUORESCENT DETEKTIONSKONJUGAT

Metoder och material

Koppling av anti-human-IgE-antikropp (anti-hIgE) till polystyrenpartikel: Anti-hIgE kopplades till polystyrenpartiklar belagda med fenyl-dextran (framtagna enligt Exempel 1) med CDAP (1-cyano-4-dimetylamino-pyridiniumbromid) (Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1) (1983) 209-210). Avsaltning och buffertbyte av anti-

30 -12- 1998

22

hIgE utfördes genom gelfiltrering (PD-10, Amersham Pharmacia Biotech AB) i NaHCO_3 , 0.1 M, pH 8,5.

0,35 g polystyrenpartiklar (2% lösning) aktiverades med 5,2 mL CDAP (0,44 M) och 4,2 mL TEA (0,2 M trietylamin, Riedel-deHaën, Tyskland). CDAP tillsattes under omrörning 60 sek och TEA under 120 sek. Fem gångers överskott av iskylt avjoniserat vatten tillsattes. Partiklarna centrifugerades vid 12.100xg (25 min, Beckman, J-21, JA-20, 10.000 rpm). Den erhållna pelleten löstes upp i iskylt avjoniserat vatten och tvättades en gång med iskylt avjoniserat vatten och centrifugerades sedan vid 12.100xg. 50 mg anti-hIgE kopplades till de aktiverade partiklarna (2%, 0,35 g i 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5). Inkubering under omrörning utfördes därefter i 1 timme vid +4°C. Efter centrifugering avaktiverades partiklarna med glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05 M i 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,5. Inkubering under omrörning skedde sedan över natt vid +4°C. Kopplade partiklar tvättades 2 gånger med 20 mM boratbuffert pH 8,5, varefter partikelkoncentrationen bestämdes spektrofotometriskt vid $A_{600 \text{ nm}}$ med obehandlade partiklar som referens. Kopplad proteinkoncentration bestämdes genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid kopplingen.

Koppling av anti-hIgE antikroppar till detektionspartiklar: Antikroppar mot hIgE klyvda med pepsin till fab'2 fragment kopplades till fluorescenta polystyrenpartiklar med aldehydgrupper på ytan (Molecular Probes C-17177 TransFluoSpheres, aldehyde-sulfate microspheres, 0,1 μm , 633/720, 2 % solids). 23 mg antikropp kopplades sedan till 66 mg partiklar i 50 mM NaPO_4 , pH 6,5, över natt i rumstemperatur, varefter 205 μL NaCNBH_4 (5 M) tillsattes för att reducera kopplingen under 3 timmar i rumstemperatur. Centrifugering utfördes vid 20.800 x g i 50 min (50 min i Eppendorf 5417R, 14.000 rpm), och avaktivering i glutaminsyra 0,05 M och asparaginsyra 0,05 M i avjoniserat vatten pH 6,5 skedde sedan över natt under omrörning i rumstemperatur. Därefter centrifugerade man på

nytt vid 20.800 x g, varefter blockering utfördes med 0,2 % BSA i 50 mM NaPO₄, pH 7,4, med 0,05 % NaN₃ och man inkuberade över natt vid +4°C. Man centrifugerade sedan vid 20.800 x g och tvättade två gånger med blockeringsbuffert som sedan också användes för förvaring. Partikelkoncentration bestämdes i fluorimeter (Perkin-Elmer LS50B) med standardkurva gjord av ursprungspartikeln. Kopplad proteinkoncentration bestämdes genom att ha radioaktivt anti-hIgE närvarande vid kopplingen.

Deponering av anti-hIgE-kopplade partiklar på membran och appliceringszoner: Utfördes enligt Exempel 1; förutom att inplastorremsorna var utbytta mot tejpremsor (2 mil clear polyester Arcare med lim på ena sidan)

Testmetodik: Remsor med åtskilda appliceringszoner monterades på ett lutande plan ca 16° i en hållare. Upptill (0.5 cm) på remsan (och med detektionszonen som närmaste zon) placerades två sugande membran (Whatman, 17 Chr, bredd 3,4 cm) ovanpå varandra. Hållaren gav också ett konstant tryck på de sugande membranen. För simultan applicering av reagens till de fyra delzonerna användes en multikanals Finnpipett (Labsystems). Multipipetten laddades så att serumprov (30 µL) applicerades i appliceringszonen närmast detektionszonen med ordningen buffert (15 µL), fluorescent partikelkonjugat (30 µL) och buffert (30+30 µL) i respektive uppströms belägen appliceringszon.

För sekventiell applicering till remsorna utan zonavgränsare applicerades, först 30 µL prov på nederkanten av remsan. Efter insugning av provvolym tillsattes i tur och ordning efter insugning buffert (15 µL), detektionspartikelkonjugat (30 µL) och buffert (30+30 µL). Partikelkonjugatet var suspenderat i assaybuffert som bestod av NaPO₄ 0,1 M, BSA 3 %, NaN₃ 0,05 %, sukros 10 %, NaCl 0,15 M, bovint gammaglobulin 0,05 %, pH 7,5. Tidtagningen startade med appliceringen av provet, och tiden tills den sista bufferten sugits in i membranet

noterades. Det fluorescenta partikelkonjugatets bindning till detektionszonen kvantifierades genom scanning med en röd diodlaser (635 ± 5 nm). Som prov användes IgE-standardkoncentrationer i plasmamiljö (0, 0,5, 2, 10, 50, och 200 KU/L).

Resultat:

Precis som i Exempel 1 vandrade vätskorna ut ur appliceringszonen i den ordning de låg. Tid för helt test med simultan tillsättning var ca 20 minuter och tid för test med sekventiell tillsättning var ca 25 minuter.

Tabell 2: Analysresultat från körningar med sekventiell tillsättning i en zon och från simultan tillsättning i 4 delzoner (buffert, analytiskt detekterbar reaktant, buffert, prov).

KU/L	Simultan tillsättning till 4 delzoner	Sekventiell tillsättning till en zon
0	0,048*	0,038*
0,5	0,053	0,047
2	0,085	0,074
10	0,286	0,256
50	1,334	1,291
200	2,507	2,487

*= scanning signal (Vmm)

20

Tabell 2 visar att upptaget är jämförbart för remsor med diskreta applikationszoner jämfört med när tillsättning sker i en och samma zon. Försöket visar därför att man kan uppnå samma resultat om samtidig tillsättning sker till zonsekvensen VZ₄B, VZ₃R*, VZ₂B, VZ₁P som om prov, Reaktant* och buffert sätts i sekvens till en gemensam appliceringszon.

25

EXEMPEL 3: SEKVENTIELL METOD MED ZONSEKVENSEN: VZ_{5B}, VZ_{4R*}, VZ_{3B},
VZ_{2P}, VZ_{1B}, DZ. DETEKTION AV BJÖRKSPECIFIKT hIGE I TESTVARIANT MED
5 FLUORESCENT DETEKTIONSKONJUGAT

Metoder och material

Extraktion av björkpollenallergen t3, Betula verrucosa):
1 del (vikt) björkpollen (Allergon, Sverige) extraherades
10 med 10 delar (volym) 0,1 M fosfatbuffert, pH 7,4.
Extraktionen pågick i 2 timmar på skakbord vid + 4°C.
Extraktet centrifugerades vid 4000 rpm under 1,75 timmar.
Efter filtrering applicerades lösningen på en PD-10 kolonn
(Pharmacia Biotech AB) och eluerades ut i 0,1 M NaHCO₃, pH
15 8,5. t3-eluatet (benämnes: t3-extrakt 1/14) lämnades till
aminosyraanalys för bestämning av den totala proteinhalten.

Koppling av björkpollenallergen till polystyrenpartikel:
t3-extrakt kopplades till fenyl-dextranbelagda
20 polystyrenpartiklar (framtaga enligt Exempel 1) med CDAP.
Kopplingen skedde analogt med kopplingen av hIgE.

Polystyrenpartiklar (2128 mg) belagda med fenyl-dextran i
30 vol-% aceton, 2 % partikelsuspension, aktiverades med
954 mg CDAP (100 mg/mL i 30 % aceton) och 7,63 mL 0,2 M
25 trietylamin (TEA, Riedel-de Haen, Tyskland). CDAP
tillfördes under omrörning och TEA tillfördes droppviss
under 90 sekunder och omrörning i totalt 120 s. Reaktionen
avbröts genom tillsats av 30 % aceton (4 ggr volymen) och
centrifugering vid 12.400 g i 35 min. Partiklarna tvättades
30 1 gång med avjoniserat vatten.

640 ml t3-extrakt 1/14 i 0,1 NaHCO₃, pH 8,5 tillfördes de
aktiverade partiklarna och koppling pågick i 1 timme på
skakbord. Efter centrifugering avaktiverades partiklarna
med 0,05 M asparaginsyra och 0,05 M glutaminsyra i 0,1
35 NaHCO₃, pH 8,5. Inkubering skedde sedan på skakbord över
natt vid +4°C. Partiklarna tvättades därefter 2 ggr med 50
mM NaPO₄, 0,05 % NaN₃, pH 7,4. Partikelkoncentrationen
bestämde spektrofotometriskt vid 600 nm med obelagda

3 0 -12- 1998

polystyrenpartiklar som referens. t3-kopplade polystyrenpartiklar lämnades till aminosyraanalys för bestämning av den totala proteinhalten.

5 Deponering av t3-kopplade polystyrenpartiklar på membran:

På nitrocellulosaflik med polyesterbaksida (Whatman, 8 µm, 5 cm bred) applicerades zoner av t3-kopplade partiklar spädda till 4 % partikelhalt i 50 mM NaPO₄, 10 % sukros, 0,05 % NaN₃, pH 7,4. Deponeringarna torkades 1 timme vid
10 30°C.

Zoner för applicering av buffert, prov och

detektionspartikelkonjugat: Väl avskilt från zonen, som innehöll deponerat material, placerades parallellt med
15 zonen och parallellt med varandra 5 stycken 1 mm breda tejpremsor (2 mil clear polyester, Arcare med lim på ena sidan) på 5 mm avstånd från varandra. Tejpremsorna definierade på detta sätt fem olika 5 mm breda zoner. Flaken klipptes vinkelrätt mot zonen innehållande deponerat
20 material till remsor med 0.5 cm bredd (längden på remsan blev då 5 cm) (Singulator: Matrix 1201 membrane cutter, Kinematic automation). De slutliga remsorna uppvisade fem zoner (appliceringszoner) åtskilda av tejpremsor som zonavgränsare och en separat zon med deponerat björkpollen
25 (detektionszon). Som jämförelse tillverkades remsor utan zonavgränsare, d.v.s. utan åtskilda appliceringszoner.

Testmetodik: Remsor med åtskilda appliceringszoner monterades, och reagens applicerades som i Exempel 2.

30 Buffert (20 µL) applicerades i zonen närmast detektionszonen, därefter serumprov (30 µL), buffert (20 µL), detektionspartikelkonjugat (20 µL) och buffert (30+30 µL) i respektive uppströms belägen appliceringszon. För sekventiell applicering till remsorna utan zonavgränsare
35 applicerades först 20 µL buffert i nederkanten på remsan, och efter insugning applicerades 30 µL prov i samma position och därefter buffert (20 µL), fluorescent partikelkonjugat (20 µL) och buffert (30+30 µL). För alla

tillsättningar hade den föregående tillsatsen sugits in av remsan. Detektionspartikelkonjugatet och buffert var enligt Exempel 2.

5 Resultat:

Med appliceringszonen bestående av fem delzoner och med simultan tillsättning till dessa visade det sig att vätskorna, precis som i exemplen ovan, vandrade ut ur appliceringszonen i den ordning de låg. Den tid som behövs för helt test med simultan tillsättning var ca 21 min och den tid det tog för ett helt test med sekventiell tillsättning var ca 27 min.

Tabell 3: Analysresultat från körningar med sekventiell tillsättning i en zon och från simultan tillsättning i 5 delzoner (buffert, analytiskt detekterbar reaktant, buffert, prov, buffert).

	Simultan tillsättning till 5 delzoner	Sekventiell tillsättning till 1 zon
neg	0,067*	0,058*
pos 1	1,911	2,608
pos 2	0,299	0,375

*= scanning signal (Vmm)

20

I tabell 3 visas att upptaget minskar något för remsor med diskreta applikationszoner jämfört med när tillsättning sker i en och samma zon. Minskningen är dock marginell och beror troligtvis på att flödes hastigheten vid simultan tillsättning var något förhöjd. Försöket visar därför att man kan uppnå i stort sett samma resultat om samtidig tillsättning sker till zonsekvensen VZ₅B, VZ₄R*, VZ₃B, VZ₂P, VZ₁B som om prov, Reaktant* och buffert sättes i sekvens till en gemensam appliceringszon.

30

PATENTKRAV

1. Förfarande för att bestämma en analyt i ett prov i en
 5 flödesmatris med hjälp av ett transportflöde av en
 eller flera biospecifika affinitetsreaktanter, av vilka
 minst en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en
 är fast förankrad i matrisen (Reaktant I), och
 flödesmatrisen uppvisar:
- 10 A) en appliceringszon för vätska (VZ), som innehåller
 buffert och prov och eventuellt en eller flera av
 reaktanterna, dock ej Reaktant I,
 B) en nedströms VZ belägen detektionszon (DZ) med den
 fast förankrade reaktanten (Reaktant I), och
 15 C) eventuellt en eller flera zoner i vilka någon av
 reaktanterna har fördeponerats,
 varvid man (i) initierar flödet mot detektionszonen
 genom tillsats av vätskan med prov i applizeringszonen
 VZP för transport av analyt och reaktanter mot
 20 detektionszonen (DZ), och (ii) påvisar den mängd
 Reaktant* som bundit till DZ, varvid den påvisade
 mängden är relaterad till mängden analyt i provet,
kännetecknat av att
 I. flödesmatrisen uppvisar minst två appliceringszoner
 25 för vätska anordnade väsentligen intill varandra:

$$VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1 \quad DZ$$

----- >

där

- a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, och n är
 30 positionen för appliceringszonen VZ_n ,
 b) m är totala antalet appliceringszoner i vilka
 flöde initieras ($m \geq 2$),
 c) en VZ_n är appliceringszon för prov (VZ_n, P) och en
 VZ_n är för Reaktant* (VZ_n, R^*) med $n'' \geq n'$, och
 35 d) ----- > är riktningen på flödet,
 e) DZ är detektionszonen, och

- II. flöde initieras genom att man sätter vätska till vardera zonen $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ på sådant sätt att vätska_{n+1}, som sätts till appliceringszon VZ_{n+1} , transporteras genom matrisen omedelbart efter vätska_n, som sätts till närmast nedströms belägna appliceringszon VZ_n .
2. Förfarande enligt krav 1, **kännetecknat** av att $n'' > n'$ (sekventiella varianter med avseende på analyt och Reaktant*).
3. Förfarande enligt krav 1, **kännetecknat** av att $n'' = n'$ (simultana varianter med avseende på analyt och Reaktant*).
4. Förfarande enligt något av kraven 1-3, **kännetecknat** av att Reaktant* är fördeponerad i sin appliceringszon (VZ_n, R^*).
5. Förfarande enligt något av kraven 1-4, **kännetecknat** av att man sätter vätska_{n+1} till VZ_{n+1} före eller i huvudsak samtidigt med att man sätter vätska_n till VZ_n , med undantag för $n = m$ vilken zon saknar zonen VZ_{n+1} .
6. Förfarande enligt något av kraven 1-5, **kännetecknat** av att VZ_{n+1} slutar där VZ_n börjar, med undantag för $n = m$ vilken zon saknar zonen VZ_{n+1} .
7. Förfarande enligt något av kraven 1-6, **kännetecknat** av att applicering av vätska sker i huvudsak samtidigt i alla $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$.
8. Förfarande enligt något av kraven 1-7, **kännetecknat** av att $m \leq 6$; n' är 1, 2 eller 3; $n'' > n'$; $VZ_{n'+1}$, $VZ_{n'+2}$,

VZ_{n+3} , VZ_{n-1} och VZ_{n-2} är appliceringszoner för vätskor avsedda för transport av Reaktant* eller annan reaktant eller buffert utan reaktant, så långt som m , n' och n' det tillåter.

5

9. Förfarande enligt något av kraven 1-8, **kännetecknat** av att minst en av zonerna VZ_m . . VZ_n . . VZ_1 innefattar en kudde eller ett materialskikt anbringat ovanpå flödesmatrisen.

10

10. Förfarande enligt något av kraven 1-8, **kännetecknat** av att zonerna VZ_m . . VZ_n . . VZ_1 har zonavgränsare mellan varandra.

15

11. Förfarande enligt något av kraven 1-10, **kännetecknat** av att sammansättningen av transporterade komponenter från en appliceringszon VZ_n ej är samma som från närmast intilliggande appliceringszon VZ , i vilken flöde initieras, (VZ_{n+1} och

20

VZ_{n-1} , med undantag för $n = m$ och $n = 1$ vilka zoner saknar VZ_{n+1} respektive VZ_{n-1}).

25

12. Förfarande enligt något av kraven 1-11, **kännetecknat** av att minst en reaktant, annan än Reaktant*, är fördeponerad i en appliceringszon $VZ_{n...R}$ för vätska avsedd att transportera reaktanten.

30

13. Förfarande enligt något av kraven 1-12, **kännetecknat** av att $m \leq 6$ och att n' för appliceringszonen för prov ($VZ_{n,P}$) är 1, 2 eller 3.

35

14. Förfarande enligt något av kraven 1-13, **kännetecknat** av att Reaktant* har biospecifik affinitet mot analyten så att Reaktant* inkorporeras i ett komplex Reaktant'--- analyt---Reaktant* i detektionszonen i en mängd som är

relaterad till mängden analyt i provet, i vilket komplex Reaktant' har biospecifik affinitet mot analyten och är

- 5 (a) Reaktant I, eller
(b) en reaktant mot vilken Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet och vilken transporteras från VZ_n, P eller från en appliceringszon nedströms VZ_n, P .

10 15. Förfarande enligt något av kraven 1-14, **kännetecknat** av att matrisen uppvisar minst en kalibratorzon (KZ), i vilken kalibrator binds till eller i förväg är bunden till matrisen.

15 16. Förfarande enligt krav 15, **kännetecknat** av att kalibratorzonen eller -zonerna (KZ) har en bindare för kalibratoren fast förankrad i matrisen, varvid kalibratoren eventuellt är fördeponerad i matrisen uppströms kalibratorzonen eller -zonerna.

20 17. Förfarande enligt något av kraven 1-14, **kännetecknat** av att
a. analyten är vald bland antigen i allmänhet, och
b. metoden utföres som en del i diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.

25 18. Anordning för att bestämma en analyt i ett prov i en flödesmatris med hjälp av ett transportflöde av en eller flera biospecifika affinitetsreaktanter, av vilka minst en är analytiskt, detekterbar (Reaktant*) och en
30 är fast förankrad i matrisen (Reaktant I), innefattande en flödesmatris som uppvisar:

- A) en appliceringszon för vätska (VZ), som innehåller buffert och prov och eventuellt en eller flera av reaktanterna, dock ej Reaktant I,
35 B) en nedströms VZ belägen detektionszon (DZ) med den fast förankrade reaktanten (Reaktant I), och
C) eventuellt en eller flera zoner i vilka någon av reaktanterna har fördeponerats,

kännetecknad av att

flödesmatrisen uppvisar minst två appliceringszoner för vätska anordnade väsentligen intill varandra:

$VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ DZ

5

----- >

där

a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, och n är positionen för appliceringszonen VZ_n ,

10

b) m är totala antalet appliceringszoner i vilka flöde initieras ($m \geq 2$),

c) en VZ_n är appliceringszon för prov (VZ_n, P) och en VZ_n är för Reaktant* (VZ_n, R^*) med $n'' \geq n'$, och

d) ----- > är riktningen på flödet, och

e) DZ är detektionszonen.

15

19. Anordning enligt krav 18, **kännetecknad** av att $n'' > n'$ och att anordningen är avsedd för sekventiell transport av analyt och Reaktant*.

20

20. Anordning enligt krav 18, **kännetecknad** av att $n'' = n'$ och att anordningen är avsedd för simultan transport av analyt och Reaktant*.

25

21. Anordning enligt något av kraven 18-20, **kännetecknad** av att Reaktant* är fördeponerad i sin appliceringszon (VZ_n, R^*).

30

22. Anordning enligt något av kraven 18-21, **kännetecknad** av att VZ_{n+1} slutar där VZ_n börjar, med undantag för $n = m$ vilken zon saknar zonen VZ_{n+1} .

23. Anordning enligt något av kraven 18-22, **kännetecknad** av att $m \leq 6$; n' är 1, 2 eller 3; $n'' > n'$; $VZ_{n'+1}$, $VZ_{n'+2}$, $VZ_{n'+3}$, $VZ_{n'-1}$ och $VZ_{n'-2}$ är appliceringszoner för vätskor

avsedda för transport av Reaktant* eller annan reaktant eller buffert utan reaktant, så långt som m, n' och n' det tillåter.

- 5 24. Anordning enligt något av kraven 18-23, **kännetecknad** av att zonerna $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ har zonavgränsare mellan varandra.
- 10 25. Anordning enligt något av kraven 18-23, **kännetecknad** av att minst en av zonerna $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ innefattar en kudde eller materialskikt anbringat ovanpå flödesmatrisen.
- 15 26. Anordning enligt något av kraven 18-25, **kännetecknad** av att minst en reaktant, annan än Reaktant*, är fördeponerad i en appliceringszon $VZ_{n,\dots,R}$ för vätska avsedd att transportera reaktanten.
- 20 27. Anordning enligt något av kraven 18-26, **kännetecknad** av att $m \leq 6$ och att n' för appliceringszonen för prov ($VZ_{n,P}$) är 1, 2 eller 3.
- 25 28. Anordning enligt något av kraven 18-27, **kännetecknad** av att detektionszonen DZ innefattar fast förankrad Reaktant I, och att en reaktant mot vilken Reaktant I uppvisar biospecifik affinitet eventuellt är fördeponerad i $VZ_{n,P}$ eller i en appliceringszon nedströms $VZ_{n,P}$.
- 30 29. Anordning enligt något av kraven 18-28, **kännetecknad** av att flödesmatrisen uppvisar minst en kalibratorzon KZ, i vilken kalibrator eller bindare för kalibratören är fast förankrad i matrisen.
- 35 30. Anordning enligt krav 29, **känn tecknad** av att kalibratorzonen eller -zonerna (KZ) har en bindare för

kalibratorn fast förankrad i matrisen, och att kalibrator är fördeponerad i matrisen uppströms kalibratorzonen eller -zonerna.

- 5 31. Anordning enligt något av kraven 18-30, **kännetecknad** av att den är avsedd för diagnosticering av allergi eller autoimmun sjukdom.
- 10 32. Testkit, **kännetecknat** av att det innefattar (i) en anordning enligt något av patentkraven 17-29 och (ii) Reaktant*.
- 15 33. Testkit enligt krav 32, **kännetecknat** av att det dessutom innefattar (iii) kalibrator när bindare för kalibrator är fast förankrad i matrisen.

SAMMANDRAG

Ett förfarande resp. en anordning och ett testkit för att bestämma en analyt i ett prov i en flödesmatris med hjälp av ett transportflöde av en eller flera biospecifika affinitetsreaktanter, av vilka minst en är analytiskt detekterbar (Reaktant*) och en är fast förankrad i matrisen (Reaktant I), har de kännetecknande dragen att

- 10 A. flödesmatrisen uppvisar minst två appliceringszoner för vätska:

$$\begin{array}{ccccccc} \text{VZ}_m & . & . & . & \text{VZ}_n & . & . & . & \text{VZ}_1 & & \text{DZ} \\ \hline & & & & & & & & & & > \end{array}$$

där

- 15 a) VZ_n är en appliceringszon för vätska, och n är po-
sitionen för appliceringszonen VZ_n ,
b) m är totala antalet appliceringszoner i vilka
flöde initieras ($m \geq 2$),
c) en VZ_n är appliceringszon för prov (VZ_n, P) och en
20 VZ_n är för Reaktant* (VZ_n, R^*) med $n'' \geq n'$, och
d) ----- \rightarrow är riktningen på flödet,
e) DZ är detektionszonen, och

- 25 B. flöde initieras genom att man sätter vätska till vardera zonen $VZ_m \dots VZ_n \dots VZ_1$ på sådant sätt att vätska $_{n+1}$, som sätts till appliceringszon (VZ_{n+1}), transporteras genom matrisen omedelbart efter vätska $_n$ som sätts till närmast nedströms belägna appliceringszon VZ_n .